

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Martina Stiborová**

Imunologické příčiny mužské neplodnosti  
Immunological causes of male infertility

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Iva Brynychová

Praha 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06. 05. 2017

Podpis.....

Martina Stiborová

**Poděkování:**

Především bych ráda poděkovala mé školitelce Mgr. Ivě Brynychové za vedení při zpracovávání mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat za cenné rady a připomínky prof. MUDr. Zdence Ulčové-Gallové, DrSc. a RNDr. doc. Janě Pěkníkové, CSc. a za poskytnutý studijní materiál RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D..

## **Abstrakt**

Neplodnost, tedy neschopnost počít dítě po ročním pravidelném nechráněném styku, se vyskytuje u přibližně 15 % partnerských dvojic. Vedle genetických, anatomických, hormonálních a infekčních příčin se ukazuje také důležitost imunopatologických mechanismů, které se podílejí na neplodnosti z 15 %. Imunitní systém má chránit vnitřní stálost organismu a reagovat na tzv. „nebezpečné“ signály, kterým mohou být spermie jako autoantigeny u mužů a alloantigeny u žen. Zdravý jedinec má vytvořené ochranné mechanismy k ochraně spermií před možným útokem imunitního systému. Selhání ochranných mechanismů a přirozeného imunologického systému může vést ke vzniku protilátek proti spermiím. Protilátky proti proteinům spermií negativně ovlivňují fertilizační schopnost spermií a jsou jednou z hlavních příčin neplodnosti.

Práce popisuje možný vznik protilátek proti spermiím u obou pohlaví. Také přibližuje vývoj spermií, imunologické vlastnosti pohlavního traktu u mužů i žen, a nakonec stručně shrnuje vlastnosti protilátek proti spermiím a léčbu imunologické neplodnosti.

### **Klíčová slova:**

Reprodukce, neplodnost, spermie, protilátky proti spermiím, autoimunita

## **Abstract**

Infertility is defined as the inability to persuade a child after one year of regular unprotected contact, occurs in about 15% of partner couples. In addition to genetic, anatomical, hormonal and infectious causes, the importance of immunopathological mechanisms that contribute to infertility is 15%. The immune system is designed to protect the body's intrinsic stability and respond to so-called "dangerous" signals that can be induced by sperm as autoantigens for men and alloantigens for woman. A healthy individual has protective mechanisms in place to protect sperm from possible attack of the immune system. Failure of protective mechanisms and the natural immune system can result in antibodies against sperm. Antibodies against sperm proteins negatively affect sperm fertilization and are one of the main causes of infertility.

This paper describes the possible occurrence of anti-sperm antibodies in both sexes. It also describes the development of sperm, immunological properties of the male and female sexual tract, and briefly summarizes the properties of anti-sperm antibodies and the treatment of immunological infertility.

## **Key words:**

Reproduction, infertility, sperm cells, antisperm antibodies, autoimmunity

## Obsah

Abstrakt .....	IV
Abstract .....	V
Obsah.....	VI
Seznam zkratk.....	VII
1 Úvod .....	1
2 Spermie v mužském reprodukčním traktu.....	2
2.1 Spermatogeneze.....	2
2.1.1 Spermiogeneze .....	3
2.2 Maturace spermií v epididymis .....	4
3 Spermie v ženském reprodukčním traktu.....	5
3.1 Kapacitace.....	5
3.2 Akrozomální reakce.....	6
4 Imunitní systém a ochranné mechanismy pohlavního traktu .....	7
4.1 Ochranné prostředí varlat a hematotestikulární bariéra.....	7
4.2 Epididymis a hematoepididymální bariéra .....	10
4.3 Semenná plasma .....	10
4.4 Ochranné mechanismy reprodukčního traktu žen .....	11
5 Imunologické příčiny neplodnosti – Protilátky proti proteinům spermií.....	14
5.1 Vliv ASA na funkčnost spermií.....	15
5.1.1 Aglutinace .....	15
5.1.2 Akrozomální reakce .....	16
5.1.3 Vazba na zona pellucida.....	17
5.1.4 Vazba na oolemu a následná fúze buněk.....	17
5.2 ASA u žen.....	18
5.3 ASA u mužů .....	19
6 Léčba imunologické neplodnosti.....	20
6.1 Diagnostika .....	20
6.1.1 MAR test – Test smíšené antiglobulinové reakce .....	20
6.1.2 Immunobead test – IBT test .....	20
6.2 Léčba .....	21
7 Závěr.....	23
Zdroje: .....	25
Internetové zdroje.....	31

## Seznam zkratek

<b>APC</b>	Antigen prezentující buňky
<b>APP</b>	Amyloidní prekurzorový protein
<b>ASA</b>	Protilátky proti spermiím
<b>BEB</b>	Hematoepididymální bariéra
<b>BS-17</b>	Kalpastatin
<b>BTB</b>	Hematotestikulární bariéra
<b>BV</b>	Krevní cévy
<b>CD (např. CD95)</b>	Diferenciační antigen (např. diferenciační antigen 95)
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DC</b>	Dendritické buňky
<b>eDC</b>	Epididymální dendritické buňky
<b>ESP</b>	Protein equatoriálního segmentu spermie
<b>FA-1</b>	Fertilizační antigen 1
<b>Fab</b>	Fragment vázající antigen
<b>GC</b>	Germinální buňky
<b>GM-CSF</b>	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
<b>GP20</b>	Sialoglykoprotein 20
<b>IBT test</b>	Immunobead test
<b>ICSI</b>	Intracytoplasmatická injekce spermie
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>Ig (např. IgA)</b>	Imunoglobulin (např. imunoglobulin A)
<b>IL (např. IL-17)</b>	Interleukin (např. interleukin 17)
<b>IP3</b>	Inositol trifosfát
<b>IVF</b>	<i>in vitro</i> fertilizace
<b>LC</b>	Leydigovy buňky
<b>LH</b>	Luteinizační hormon
<b>MAR test</b>	Přímý test smíšené antiglobulinové reakce
<b>MC</b>	Mastocyty
<b>M<math>\Phi</math></b>	Makrofág

<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>PIP2</b>	Fosfoinositol bisfosfát
<b>PKC</b>	Fosfokináza C
<b>PLC</b>	Fosfolipáza C
<b>PTC</b>	Pojivová tkáň
<b>rSMP-B</b>	Protein rSMP-B
<b>SC</b>	Sertoliho buňky
<b>SP</b>	Semenná plasma
<b>SPRASA</b>	Protein spermie reagující s protilátkami proti spermii
<b>TGF β</b>	Transformující růstový faktor β
<b>T<sub>H</sub></b>	Pomocný T lymfocyt ( <i>helper</i> )
<b>TJ</b>	Těsné spoje
<b>TM</b>	Testikulární makrofágy
<b>Treg</b>	Regulační T lymfocyty
<b>TRPC</b>	Transientní receptor potenciálového kanálu
<b>YLP(12)</b>	Peptid YLP(12)
<b>YWK-II</b>	Protein YWK-II
<b>ZP</b>	Zona pellucida
<b>ZP3</b>	Protein 3 na povrchu zona pellucida



# 1 Úvod

Neplodnost je dle světové zdravotnické organizace definována jako neschopnost počít dítě do 12 měsíců, při pravidelném nechráněném pohlavním styku, tzn.  $3 \times$  týdně. Neplodnost postihuje až 15 % párů na celém světě (Arap et al. 2007), což představuje 48,5 miliónů párů (Mascarenhas et al. 2012). Z těchto případů je v 60 % případů neplodnost zapříčiněna mužem samotným nebo oběma jedinci z páru (Capkova et al. 2016). Každá osmá žena a každý desátý muž mají problém s fertilitou (Datta et al. 2016).

Existují různé příčiny neplodnosti, jak u mužů, tak i u žen. Procentuální rozložení příčin se u obou pohlaví liší. Avšak imunologické příčiny neplodnosti jsou u obou pohlaví zastoupeny obdobně, a to z 15 % (Nouza et al. 2007). Jednou z imunologických příčin neplodnosti je vznik protilátek proti spermiím (ASA), které se váží na proteiny spermie a dále ovlivňují její funkce. ASA u mužů splňují kritéria definice pro autoimunitní onemocnění (Bohring and Krause 2003). ASA může být nazývána jen ta protilátka, která se váže na určitý antigen. K jejich vzniku vede například porušení hematotestikulární bariéry, což může být způsobeno např. traumaty pohlavních orgánů a obstrukcí vývodných cest. U některých žen mohou ASA vzniknout při narušené imunitě, porušené mukózní integritě, či porušeném epitelu (Marshburn and Kutteh 1994) a následně mohou reagovat se spermiemi.

ASA mají negativní vliv na pohyblivost spermií, na kontakt gamet spermie-vajíčko, na úspěšnost oplodnění vajíčka spermií a také negativně ovlivňují časný embryonální vývoj.

ASA jsou imunoglobuliny nejčastěji typu IgG, IgA, IgM, vzácně i IgE. Detekovatelné jsou v krevním séru, semenné plasmě, cervikálním hlenu, folikulární i peritoneální tekutině. Tyto protilátky se detekují pomocí smíšeného antiimunoglobulinového testu či immunobead testu.

Doposud nejúspěšnější volbou je kombinace imunosupresivní léčby spolu s injekcí spermie do vajíčka pomocí mikromanipulátoru (metoda ICSI).

Cílem této práce je formou literární rešerše popsat problematiku vzniku protilátek proti spermiím. První část této práce se věnuje problematice vývoje spermie, její cestou od varlete až k oocyту, s tím, že jsou také přiblíženy vlastnosti prostředí mužského i ženského pohlavního traktu z imunologického hlediska. Druhá část práce se zabývá vlastní problematikou protilátek proti spermiím, a nakonec je stručně popsána léčba imunologické neplodnosti.

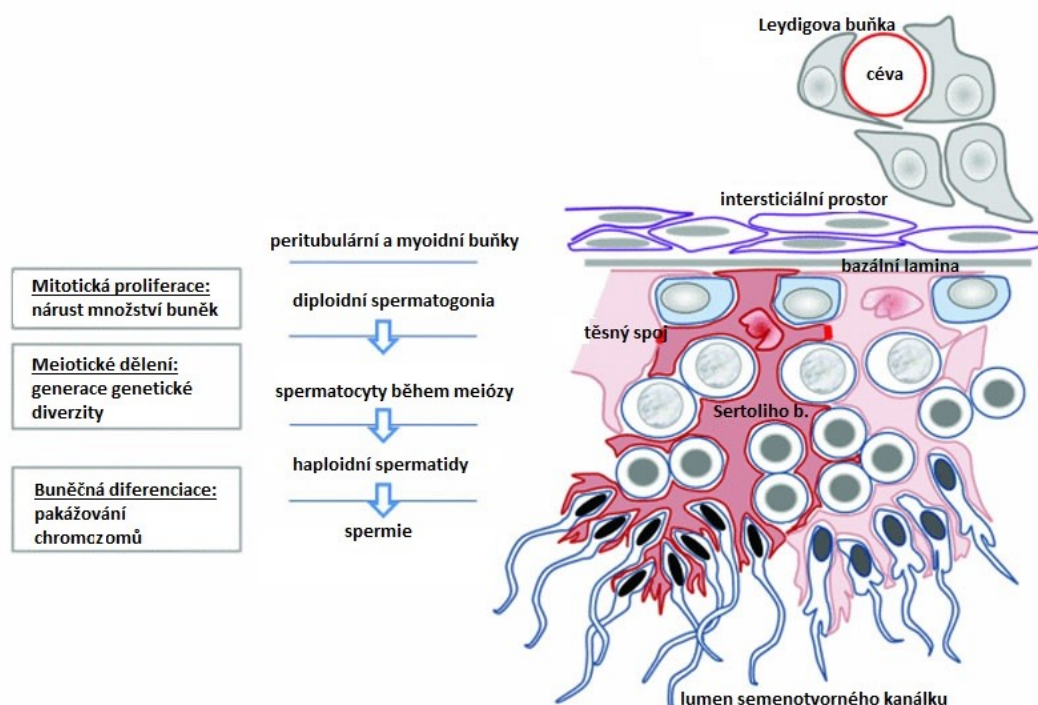
## 2 Spermie v mužském reprodukčním traktu

Spermie čili samčí pohlavní buňky se u mužů začínají tvořit až s nástupem puberty. Vznikají v semenotvorných kanálcích varlat procesem spermatogeneze a následné spermiogeneze. Takto vzniklé spermie nejsou schopny oplodnit oocyt. Musí projít maturačním zráním v epididymis, přičemž jsou následně skladovány v jeho koncové části (*causa epididymis*) až do ejakulace.

### 2.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je klíčový proces pro vznik funkčních spermií, který probíhá v semenotvorných kanálcích varlete. Tento proces může být rozdělen do částí – mitotické dělení spermatogonií, meiotické redukční dělení, a nakonec transformace kulatých buněk na typický tvar spermie během spermiogeneze. Každý z těchto kroků je klíčový v procesu spermatogeneze a následné spermiogeneze. Narušení těchto procesů může vést ke vzniku defektních spermií, nebo redukci či absenci produkovaných spermií (de Kretser et al. 1998). Spermatogenezi a spermiogenezi může narušit rakovina a její následná léčba (radioterapie, chemoterapie a chirurgická operace), nesestouplá varlata, genetické abnormality (Shinagawa et al. 2015), abnormální hormonální hladina a další (Agarwal and Allamaneni 2005).

Spermie vznikají v semenotvorných kanálcích ve vlnách, po celé délce semenotvorného kanálku. Spermie se diferencují dostředivě (Obr.1) – od bazální laminy semenotvorného kanálku do jeho lumen. Spermatogonia spolu se Sertoliho buňkami nasedají na bazální laminu. Směrem do lumen semenotvorného kanálku se vyskytují další fáze dělících se spermatogonií – spermatocyty, spermatidy a v lumen kanálku spermie. V intersticiálním prostoru se nacházejí myoidní, Leydigovy buňky a buňky imunitního systému.



Obrázek 1: Stavba semenotvorného kanálku – vznik spermií

Převzato od: Hunter et al. 2012

Počátečním krokem spermatogeneze je vznik spermatogonia typu A1 z primordiální germinální buňky. Spermatogonium A1 je kmenová buňka, ze které může opět vzniknout spermatogonium A1, či spermatogonium typu A2. Tímto způsobem následně vzniká spermatogonium typu A4, které má 3 možnosti následných kroků: může podstoupit apoptózu, nebo může vzniknout opět spermatogonium A4, anebo se může diferencovat do tzv. přechodných spermatogonií, které dávají za vznik spermatogoniím typu B. Spermatogonia typu B jsou prekurzory spermatocytů a také poslední buňky procházející mitózou (Gilbert 2000). Primární spermatocyty jsou stále diploidní, během meiózy redukují svůj počet chromozomů na polovinu, avšak chromatidy mají stále zdvojené. Při druhém meiotickém dělení vznikají plně haploidní spermatidy. Následnou spermiogenezí ze spermatid vznikají spermie.

### 2.1.1 Spermiogeneze

Během spermiogeneze spermatidy procházejí různými morfologickými změnami, při nichž získávají svůj finální vzhled. Tento proces se skládá ze čtyř hlavních kroků: kondenzace jádra a jeho přesun na okraj buňky; formace a modifikace akrozomu z Golgiho aparátu; vznik bičíku; a odstranění značného množství vlastní cytoplasmy, která je fagocytována Sertoliho buňkami (de Kretser et al. 1998).

## 2.2 Maturace spermií v epididymis

Spermie, které opouštějí testes jsou z morfologického hlediska zralé, ale nejsou schopny oplodnit oocyt. Aby byly schopné tak učinit, potřebují projít maturací v epididymis čili nadvarleti. Díky epididymální maturaci se spermie stává pohyblivou a také získává mnoho receptorů důležitých pro vazbu s oocytem.

Epididymis zajišťuje několik důležitých funkcí pro vývoj spermií: absorpci testikulární tekutiny a tím zakoncentrování spermií; tvorbu speciálního mikroprostředí pro získání pohyblivosti spermií, která je nezbytná pro oplození vajíčka; a skladování spermií před ejakulací (Jones 1999).

Jeden z nejdůležitějších procesů při epididymální maturaci je rozsáhlá přestavba proteinů, glykoproteinů a lipidových struktur na plazmatické membráně spermie. Strukturální změny mohou být následné modifikace již vzniklých struktur (relokační procesy), anebo nasedání nových struktur syntetizovaných v epididymis (Cuasnicú et al. 2002). Změny probíhají nejen na plazmatické membráně, ale také v akrozomální části (Yanagimachi 1994).

Po těchto dějích spermie opouští mužský pohlavní trakt ejakulací a setkávají se s novým, pro ně nepříznivým prostředím v ženském pohlavním traktu. V tomto prostředí podstoupí ještě dva zásadní procesy – kapacitaci a akrozomální reakci, díky nimž jsou schopny oplodnit oocyt.

### 3 Spermie v ženském reprodukčním traktu

Ejakulát obsahuje desítky až stovky miliónů pohyblivých spermií. Značné množství spermií neprojde cervikálním hlenem. Do dělohy se dostanou jen desítky až stovky spermií s progresivní motilitou, přičemž musí být morfologicky v pořádku a také mít funkční plasmatickou membránu, která správně reaguje na okolní prostředí. Z dělohy do vejcovodů putuje jen několik desítek spermií, z nichž jen deset až dvacet spermií dosáhne povrchu zona pellucida. Nakonec jen jedna oplodní oocyt (De Jonge 2005).

V ženském reprodukčním traktu dochází ke dvěma pro spermii nezbytným procesům, a to kapacitaci a akrozomální reakci. Tyto procesy jsou nepostradatelné pro úspěšné oplodnění oocytu *in vivo*.

#### 3.1 Kapacitace

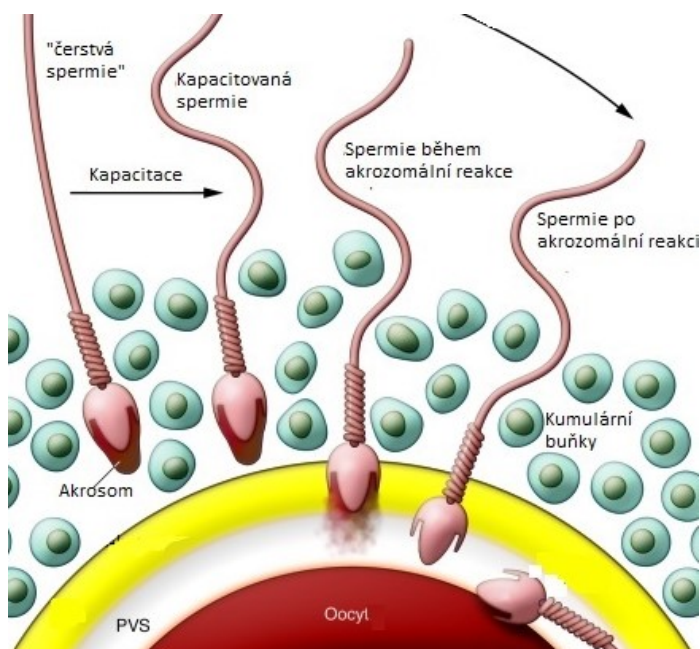
Spermie nejsou schopny oplodnit oocyt ihned po ejakulaci. Je nutné, aby strávily určitý čas v pohlavním traktu ženy, kde probíhá další část zrání spermií, která podporuje sérii fyziologických změn. Tento děj byl nezávisle na sobě zjištěn Austinem a Changem (Austin 1951; Chang 1951) a daný proces byl nazván kapacitace (Austin 1952). Dle původního popisu Austina a Changa je kapacitace charakterizována jako komplex funkčních a strukturních změn, který se odehrává na spermii. Začíná po odstranění stabilizačních faktorů spermie, pokračuje během průchodu spermie ženským pohlavním traktem a je považován za ukončený, když je spermie schopna se navázat na zona pellucida a započít akrozomální reakci (De Jonge 2005).

Prvním krokem vedoucím ke kapacitaci je odstranění nebo pozměnění dekapacitačních faktorů, což zajišťuje prostředí ženského pohlavního traktu. Dekapacitační faktory jsou přítomny v semenné a epididymální plasmě, při jejich odstranění může být započata kapacitace. Ta může začít již při průchodu cervikálním hlenem (Yanagimachi 1994).

Během kapacitace dochází například ke změnám v organizaci lipidů a proteinů v plasmatické membráně, jádře, akrozomu, intracelulární koncentraci iontů (vstup  $\text{Ca}^{2+}$ ), fosforylaci některých proteinů, modifikaci protein-proteinových interakcí, hyperaktivaci motility atd. (Gadella and Visconti 2006; Yanagimachi 1994). Důležitý děj pro správný průběh kapacitace je vyloučení cholesterolu, přičemž se tento proces odehrává v plasmatické membráně. Díky tomu se zvýší fluidita membrány, destabilizuje se plasmatická membrána, zvýší se schopnost fúzovat a na povrch spermie jsou vystaveny manózoové receptory (Benoff et al. 1993). Tyto změny připravují membránu nejen k akrozomální reakci, ale také ke kontaktu s oocytární plasmatickou membránou při fúzi spermie-vajíčko (Gadella and Visconti 2006).

### 3.2 Akrozomální reakce

Než kapacitovaná spermie splyne s oocytem (Obr. 2), musí projít vrstvou kumulárních buněk a jejich matrix, které daný oocyt obklopují. Hlavní složkou kumulární matrix je polymerizovaná hyaluronová kyselina. Oocyt je také obklopen glykoproteinovým obalem – zona pellucida (ZP), skrz kterou se spermie musí dostat. Kontakt se ZP je spouštěčem akrozomální reakce, která zajišťuje nejméně dvě funkce: penetraci skrz ZP a fúzi s membránou vajíčka (Yanagimachi 1994).



Obrázek 2: Mechanismus interakce spermie-oocyt

Převzato od: Ikawa et al. 2010

Akrozomální reakce je receptorem indukovaná exocytosa buňky. Klíčové pro vznik akrozomální reakce je vazba receptorů spermie na protein zony pellucida (ZP3), což spustí signální kaskádu. Vazba receptoru na ligand způsobí přechodný vstup iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , což vede k aktivaci fosfolipázy C (PLC). Fosfolipáza C štěpí fosfoinositol bisfosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositol trisfosfát (IP3). IP3 uvolní  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob a DAG aktivuje fosfokinázu C (PKC), což způsobí fosforylaci substrátových proteinů. Tyto procesy umožní vtok  $\text{Ca}^{2+}$  přes TRPC kanály, které indukují akrozomální reakci (Ikawa et al. 2010).

Výsledkem akrozomální reakce je několikanásobné splynutí vnější akrozomální membrány s plasmatickou membránou, čímž dochází k vyjití celé řady akrozomálních enzymů (např. hyaluronidáza, akrosin aj.) (Yanagimachi 1994). Díky tomu spermie projde ZP a může navázat na receptory plasmatické membrány oocyty a následně s ním fúzovat.

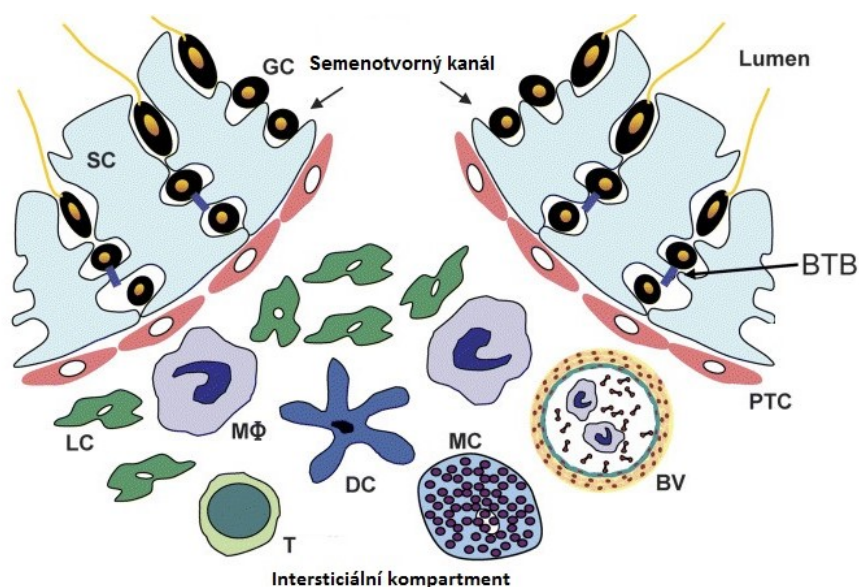
## **4 Imunitní systém a ochranné mechanismy pohlavního traktu**

V pubertě, když je imunitní systém téměř plně vyvinut, se začínají tvořit spermie ze spermatogonií. Během tohoto procesu, který byl popsán v předešlých kapitolách, se vytváří nové molekuly, které jsou exprimovány germinálními buňkami i spermiemi. Imunologický aparát může v určitých případech reagovat proti proteinům spermií a vytvářet autoantigeny u muže a aloantigeny u ženy. Z tohoto důvodu vznikly speciální mechanismy k obraně těchto buněk, aby proti nim nebyla spuštěna imunitní reakce, což by mohlo vést až k neplodnosti.

### **4.1 Ochranné prostředí varlat a hematotestikulární bariéra**

Varlata mají speciální imunitní prostředí. Patří totiž mezi orgány imunitně privilegované. Privilegované imunitní prostředí chrání imunogenní germinální buňky před vznikem imunitní reakce, a to i díky efektivní vrozené místní imunitě. Náhodné narušení tohoto rovnovážného systému může vést až ke vzniku neplodnosti, což může být způsobeno například rakovinou varlat, která může narušit vhodné imunologické prostředí varlat, čímž se následně negativně ovlivní kvalita semene (Agarwal and Allamaneni 2005).

Varlata se skládají ze dvou hlavních kompartmentů: semenotvorných kanálků (s germinálními buňkami (GC) – spermiemi) a intersticiálního prostoru. V intersticiálním prostoru se nacházejí Leydigovy buňky (LC), krevní (BV) a lymfatické cévy, makrofágy ( $M\Phi$ ), lymfocyty a pojivová tkáň (PTC) (Fawcett et al. 1973). Na bázi semenotvorného kanálku se nacházejí Sertoliho buňky (SC), které kontaktem mezi sebou vytváří těsné spoje (TJ). Tímto se podílí na vzniku hematotestikulární bariéry (BTB), která byla dříve považována za rozhodující pro vznik imunitní privilegovanosti. Avšak časná stadia imunogenních germinálních buněk se nacházejí vně BTB (Yule et al. 1988). Tudíž se na vzniku imunitní privilegovanosti podílí i jiné mechanismy než jen fyzické oddělení prostředí. Například buňky imunitního systému (makrofágy, T buňky, dendritické buňky (DC), mastocyty (MC)), ale i samotné SC a LC (Obr. 3).



Obrázek 3: Stavba testes - s imunitními buňkami; germinální buňky (GC), Sertoliho buňky (SC), hematotestikulární bariéra (BTB), Peritubulární buňky (PTC), Leydigovy buňky (LC), makrofágy (MΦ), T lymfocyty (T), Dendritické buňky (DC), mastocyty (MC), krevní cévy (BV)

Převzato od: Fijak and Meinhardt 2006

Sertoliho buňky (SC) jsou nezbytné pro správný vývoj spermií. Minimálně to prokazují tři pozorování. Zprv, nikdy nebyl pozorován stav, kdy by byly ve varlatech přítomny jen germinální buňky bez SC. Navíc schopnost přežití germinálních buněk bez přítomnosti SC, je velice omezená. Zadruhé, počet germinálních buněk je přímo spojený se správnou funkcí SC. A zatřetí, tvorba spermií je výsledkem působení endokrinních hormonů na Sertoliho buňky, ne na buňky germinální (Griswold 1998).

SC mají imunosupresivní vlastnosti. Sekretují imunosupresivní faktory, čímž potlačují imunitní odpověď (Wyatt et al. 1988). To bylo dokázáno například pokusem, kdy byly SC transplantovány do diabetických myší, což vedlo ke zlepšení diabetu u 88 % postižených. Transplantované SC produkovali protizánětlivé cytokiny, které změnily imunitní odpověď z prozánětlivé na protizánětlivou. Tím se zvýšil počet regulačních T lymfocytů (Treg) a snížilo se množství prozánětlivého interleukinu IL-17 (Fallarino et al. 2009). Sekretované molekuly jsou schopny inhibovat buněčné dělení B i T lymfocytů a snížit produkci interleukinu IL-2, který aktivuje T a B lymfocyty (De Cesaris et al. 1992). Mezi imunosupresivní faktory patří například transformující růstový faktor (TGF)  $\beta$ , který je ve varlatech exprimován převážně SC již od pubertálního vývoje (Mullaney and Skinner 1993). Dále je známo, že SC exprimují Fas ligand (FasL – CD95L) (Bellgrau et al. 1995). FasL se váže na apoptický receptor, který je přítomný na povrchu cytotoxických T lymfocytů, ale i jiných buněk, čímž spouští kaskádu vedoucí k apoptóze a tím snižuje imunitní odpověď aktivovaných lymfocytů. SC také



exprimují inhibitor (CD59) komplementu, který inhibuje prozánětlivou reakci (Lee et al. 2007). Další důležitá schopnost SC je endocytóza a degradace apoptizovaných germinálních buněk, čímž se zabraňuje možnému vzniku imunitní reakce (Chemes 1986). Z výše popsaného je zřejmé, že SC mají jedinečnou funkci ve vývoji spermií a v udržení homeostázy vnitřního prostředí varlat. Přičemž byl popsán jen zlomek jejich schopností.

Leydigovy buňky tvoří většinu intersticiálních buněk. Jejich hlavní funkcí je produkce androgenního hormonu testosteronu pod kontrolou luteinizačního hormonu (LH). Tím se hormonálně podílí na imunitní privilegovanosti testes. Fijak a kol. (2011) zjistili, že zvýšená dávka testosteronu má multifaktoriální vliv k imunoprotektivní odpovědi. Při podávání testosteronu krysám se snížil vznik autoimunitního onemocnění jen na 17 %, v případě aplikace nízké dávky testosteronu, a na 33 % při aplikaci vysoké dávky testosteronu. Oproti tomu v kontrolní skupině, kde nebyl podáván žádný testosteron, se v 80 % případů rozvinula experimentální autoimunitní orchitida. Testosteron účinně inhiboval akumulaci makrofágů a  $CD4^+$  T lymfocytů a současně selektivně zvýšil počet imunosupresivních Treg v intersticiálním prostoru testes. Také byla inhibována produkce mRNA prozánětlivých chemokinů a cytokinů. Nakonec bylo zjištěno, že testosteron snížil sekreci  $T_H1$  cytokinů, IFN- $\gamma$  a IL-2, což zabránilo nadměrné prozánětlivé reakci a následnému poškození tkáně.

Důležitou roli v udržení imunitní privilegovanosti testes mají také leukocyty (makrofágy, dendritické buňky a mastocyty) v intersticiálním prostoru.

Makrofágy jsou za běžných (nezánětlivých) podmínek přítomny jen v intersticiálním prostoru a v tubulární stěně, ale nenachází se v semenotvorném epitelu (Pollanen and Niemi 1987). Při patologickém stavu je pozorován celkový nárůst počtu makrofágů až na dvojnásobné množství, přičemž značné množství makrofágů se vyskytuje i v semenotvorných kanálcích (Frungeri et al. 2002a; Hussein et al. 2005). Testikulární makrofágy (TM) oproti makrofágům z jiných tkání (peritonea) vykazují relativně sníženou prozánětlivou odpověď, a naopak mají zvýšené imunosupresivní vlastnosti (Kern et al. 1995).

Dendritické buňky (DC) jsou nejúčinnější buňky v presentování antigenů (APC) zejména T lymfocytům. Účastní se jak antigenně nespecifické, tak antigenně specifické odpovědi. Existují v nezralé i zralé formě. Nezralá forma se aktivně podílí na udržení tolerance vůči vlastním tkáním. V nepatologických podmínkách se vyskytují právě nezralé či polozralé DC, naopak při patologickém stavu se vyskytují zralé DC, čímž se stimuluje antigenně specifická odpověď (Rival et al. 2007). Také celkový počet DC buněk během zánětlivých podmínek značně stoupá (Rival et al. 2006).

Mastocyty patří k významným buňkám imunitního systému. Jejich počet narůstá při problémech se spermatogenezí a fertilitou (Apa et al. 2002; Hussein et al. 2005). Je známá jejich prozánětlivá role v alergických reakcích. Bylo zjištěno (Lu et al. 2006), že MC pomáhají při zprostředkování buněčné Treg tolerance. Tryptáza (serinová proteáza), jeden z produktů MC, může způsobovat fibrotickou přestavbu tkáně (ztluštění tubulární stěny) a následně mít negativní vliv na plodnost (Apa et al. 2002; Frungieri et al. 2002b).

## **4.2 Epididymis a hematoepididymální bariéra**

Přítomná hematoepididymální bariéra (BEB) v epididymu ochraňuje spermie před možným kontaktem s imunitním systémem. Stejně jako hematotestikulární bariéra je tvořena těsnými spoji sousedních buněk. Avšak struktura TJ není po celé délce epididymu jednotná (Cyr et al. 1995). Oproti BTB je méně efektivní, makrofágy a lymfocyty jsou běžně pozorovány v epididymu (Dym and Romrell 1975; Hooper et al. 1995), tudíž zde není tak striktní rozdělení spermií a imunitních buněk. Ale výsledným narušením či ztrátou součásti BEB či epididymálního epitelu vede ke snížené plodnosti, nebo dokonce neplodnosti (Dube et al. 2008; Dube et al. 2010).

Podle Da Silvy a kol. (2011) důležitou roli v epididymálním epitelu mají APC, které byly pojmenovány epididymální dendritické buňky (eDC). V iniciálním segmentu epididymu je většina epiteliálních buněk v přímém kontaktu s eDC. eDC vysouvají své dendrity směrem k těsným spojům TJ BEB, čímž přispívají k presentaci nových antigenů ze spermií, které přichází z testes. V této studii byla také objevena přítomnost mononukleárních fagocytů (MP). U myšího modelu bylo prokázáno, že se MP účastní fagocytózy apoptizovaných buněk, kde projdou morfologickou a fenotypovou změnou. Díky tomu je zachována celková integrita BEB (Smith et al. 2014).

Oproti testes, buněčné a molekulární mechanismy imunitní regulace v epididymis nejsou doposud příliš zřetelně objasněny a pochopeny (Da Silva et al. 2011) a autor doporučuje se tímto problémem nadále zabývat.

## **4.3 Semenná plasma**

Semenná plasma (SP) patří mezi zcela přirozené prostředí pro spermie. Je složena ze 100 až 200 bílkovin nebo peptidů a obsahuje výměšky semenných váčků, prostaty a přídatných žlázek (bulbouretrálních). Látkové složení SP je prakticky velmi podobné složení lidské krevní plasmy s rozdílným obsahem cukrů. V semenné plasmě je vyšší obsah fruktózy a nižší glukózy.

Prostatická SP brání toxickému poškození spermií tím, že obsahuje antioxidační látky (vápník, hořčík a zinek) (Ulčová-Gallova and Lošan 2013).

SP zdravého fertilního muže obsahuje značné množství imunologických faktorů, což bylo zkoumáno v rozsáhlé studii autorů Politch a kol. (2007). Ti prokázali, že v SP je vysoká koncentrace IgG a IgA, dva multifaktoriální růstové faktory (TGFβ1 a IL-7) a chemokiny. TGFβ1 je hlavní imunosupresivní faktor v lidském semeni a je aktivován kyselým pH vagíny (Nocera and Chu 1995; Politch et al. 2007). Hodnoty prozánětlivých cytokinů a chemokinů zprostředkovávajících humorální a buněčnou odpověď u zdravých fertilních jedinců jsou nízké (Politch et al. 2007).

Důležitým modulátorem v SP je také prostaglandin E2 (PGE2). Může mít pro i protizánětlivé účinky, což bylo zjištěno v mnoha studiích a přehledně shrnuto v review od Clarka a Schusta (2013). Jeho hlavní funkce jsou: inhibice imunitní odpovědi zprostředkované fagocytujícími buňkami (neutrofily, makrofágy); potlačení NK buněk, cytotoxických T lymfocytů a T<sub>H</sub>1 buněčné odpovědi; aktivace DC, s omezením lákat naivní, paměťové a efektorové T buňky; a stimulace produkce Treg a supresorových buněk odvozených od myeloidní linie (Clark and Schust 2013).

Nejen že SP tvoří vhodné prostředí pro spermie, ale také přímo ovlivňuje ženský pohlavní trakt. Molekuly ze semenné plasmy jsou schopny ovlivnit ženský imunitní systém tak, aby byl schopen tolerovat možný plod. Seminální TGFβ1 dokáže v ženském pohlavním traktu vyvolat zánětlivou kaskádu na epiteliálních buňkách dělohy. Tudiž je považován za klíčový faktor změn, které se odehrávají v děloze během preimplantační periody těhotenství (Tremellen et al. 1998).

Bylo pozorováno, že se zvýší pravděpodobnost úspěšné implantace časných embryí a jejich následný vývoj, pokud je žena, podstupující umělé oplodnění, vystavena kontaktu se SP (Tremellen et al. 2000). Také bylo zjištěno, že dlouhodobý kontakt se SP (dlouhodobý sexuální vztah delší než 6 měsíců s různými muži) snižuje pravděpodobnost vzniku preeklampsie (Kho et al. 2009).

#### **4.4 Ochranné mechanismy reprodukčního traktu žen**

Imunitní systém je tvořen vrozenou a adaptivní imunitou. Mezi vrozené ochranné mechanismy ženského pohlavního traktu patří složky mechanické, chemické a buněčné. Ochrana ženského pohlavního traktu z imunologického hlediska je ovlivňována na mnoha úrovních: hormony, cytokiny, chemokiny, růstové faktory, buňky vrozené a získané imunity.

Všechny tyto složky a mnoho dalších ochraňuje pohlavní trakt před možnými patogeny či nežádoucími imunitními reakcemi.

Pohlavní trakt se dá rozdělit na dvě části – horní a dolní. V horní části se nacházejí vejcovody, děloha s endometriem a endocervix. V dolní části jsou ektocervix a vagína. Obě části mají rozdílné imunitní vlastnosti. Vaginální pH se pohybuje v rozmezí 3,8 – 4,8, díky přítomným bakteriím rodu *Lactobacillus* (Boskey et al. 1999). Takto kyselé pH vytváří nepříznivé podmínky pro možné patogeny, ale i spermie. Naopak pH cervikálního hlenu se pohybuje v rozmezí  $\pm 7$ , což je vhodnější prostředí pro spermie (Correa et al. 2001).

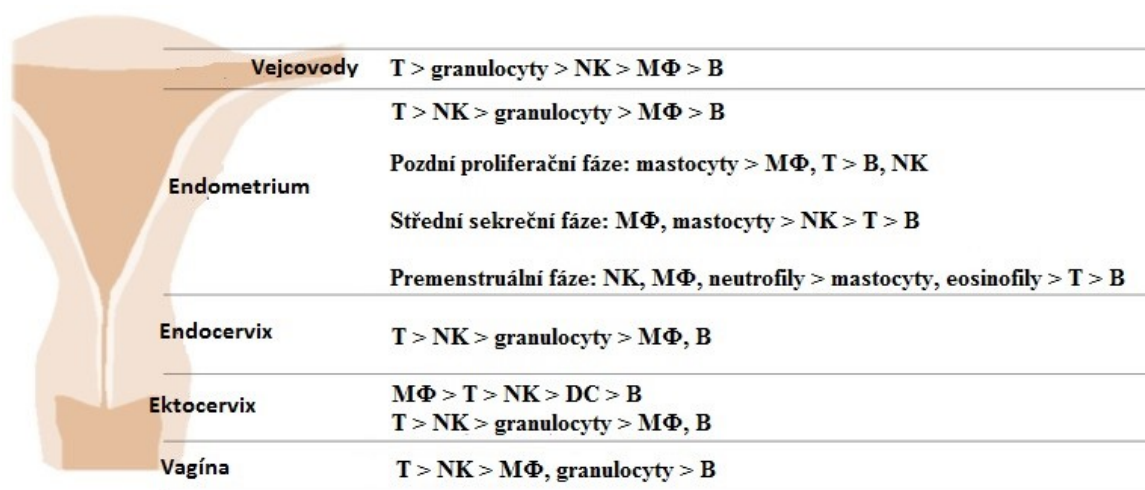
Důležitou roli v ženském pohlavním traktu má děložní hrdlo neboli cervix. Produktem cervixu je hlen, který zabraňuje možnému vniknutí patogenů do horních částí reprodukčního traktu. Existují nejméně dva typy hlenu v souvislosti s menstruačním cyklem. Během ovulace se 10 – 20× zvýší objem sekretovaného cervikálního hlenu z původních 20 – 60 mg hlenu/den (Moghissi and Syner 1976). Během doby ovulace je hlen tekutější a usnadňuje spermiu cestu k vajíčku. Bigelow a kol. (2004) navrhuje využít této vlastnosti hlenu k určení vhodné doby pro početí, místo předpovídání doby ovulace. Po ovulaci se kvalita hlenu mění pod vlivem progesteronu. Hlen je silnější, lepivější a je produkován v menším množství než hlen ovulatoří (Ulcova-Gallova 2010).

Kontakt SP s cervikálním a děložním epitelem vyvolává nárůst cytokinů (například faktor stimující vznik kolonií granulocytů a makrofágů – GM-CSF) a chemokinů, kvůli nimž naroste počet makrofágů, granulocytů, dendritických buněk a T lymfocytů v endometriu a cervixu v postkoitální zánětlivé reakci – leukocytární (Pandya and Cohen 1985; Robertson et al. 1998; Sharkey et al. 2012). Zánětlivá reakce vyvolaná SP je důležitá pro odstranění přebytečných spermií a mikroorganismů, které vnikly do dělohy během koitu, aktivaci specifické imunitní odpovědi proti antigenům ve spermatu, tkáňovou remodelaci endometria a expresi cytokinů a růstových faktorů spojených s časným vývojem preimplantovaného embrya (Robertson 2005).

Rozložení imunitních buněk se v různých částech pohlavního traktu liší, což je přehledně shrnuto v Obr.4.

Ve vagíně a ektocervixu jsou přítomny T buňky – CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> těsně pod epitelem v lamina propria. T buňky (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) mohou vytvářet lymfoidní agregáty, jejich střed tvoří B buňky (CD19<sup>+</sup> a CD20<sup>+</sup>) (Johansson et al. 1999). Jiné B buňky (CD38<sup>+</sup>), které produkují imunoglobuliny, jsou rozprostřeny v subepiteliálním stroma (Johansson et al. 1999). V endometriu se podíl imunitních buněk liší v závislosti na fázi menstruačního cyklu. Endometrium je nejbohatší tkáň, co se týče počtu imunitních buněk na buňku tkáně samotné,

v porovnání s ostatními tkáněmi reprodukčního traktu (Lee et al. 2015). Celkově je však horní část pohlavního traktu (vejcovody a děloha) hojnější na leukocyty než dolní část (cervix a vagína) (Givan et al. 1997).



Obrázek 4: Distribuce hlavních leukocytů v ženském pohlavním traktu

Převzato od: Lee et al. 2015

10 % všech lymfocytů v celém reprodukčním traktu tvoří makrofágy (Givan et al. 1997). Makrofágy patří mezi buňky vrozené imunity. Jsou to profesionální fagocyty, jejichž funkcí je rozeznat patogen, odstranit jej a ovlivnit imunitní odpověď pomocí cytokinů a chemokinů. Jejich funkce a množství je ovlivňováno hladinou estrogenů. Bylo zjištěno, že estrogeny podporují prozánětlivou odpověď. Největší množství makrofágů je pozorováno během doby ovulace (Carruba et al. 2003). Společně s DC patří mezi APC, čímž se podílí na vzniku adaptivní imunitní odpovědi, jež zahrnuje odpovědi  $T_H1$  (buněčná),  $T_H2$  (humorální), Treg a  $T_H17$ . Humorální složka je tvořena především cytokiny a protilátkami, které se váží na specifický antigen. Navázáním protilátky na antigen je označen možný patogen, který je následně fagocytován nebo degradován komplementovou kaskádou. V reprodukčním traktu jsou přítomny protilátky IgA a IgG, stejně jako u gastrointestinálního či respiračního traktu.

Je velmi důležité porozumět ženskému reprodukčnímu traktu, jeho imunitnímu systému, popřípadě i jeho kontaktu se semennou plazmou. Nové poznatky mohou pomoci s léčbou nejen onemocnění způsobených různými patogeny, ale i přispět k novým metodám léčby patologií těhotenství a problémů s vlastním otěhotněním.

## 5 Imunologické příčiny neplodnosti – Protilátky proti proteinům spermií

Již od svého vzniku se spermie setkává s různými prostředími, co se týče imunologického, chemického a fyzikálního hlediska. Po uvolnění ze semenotvorného kanálku prochází mužským pohlavním traktem a následně se dostává do ženského traktu. V průběhu této cesty dochází k remodelaci povrchu spermie (popsáno v předchozích kapitolách) například během epididymální maturace, při kontaktu se semennou plazmou během ejakulace, během maturace v ženském pohlavním traktu (kapacitace) a během akrozomální reakce. Všechny tyto změny proteinů v membráně, nejen že připravují spermii k možnému splynutí oocytem, ale i odhalují potencionálně antigenní struktury proti nimž může být zahájena imunitní reakce nejen u mužů, ale i u žen. To může vést ke vzniku protilátek proti spermiím, známých pod názvem ASA.

Prevalence u neplodných párů se pohybuje podle různých zdrojů v rozmezí 9 – 30 % (Collins et al. 1993; Menge et al. 1982). U neplodných mužů se pohybuje v rozmezí 8 – 21 % a neplodných žen mezi 6–23 %. Avšak ASA se vyskytuje i u plodných jedinců, a to s prevalencí okolo 0,9 – 4 % (Naz 2004). U některých plodných mužů s normálním spermioqramem bylo zjištěno, že jejich spermie na svém povrchu mohou mít navázané protilátky typu IgG, které pokrývají více než 50 % povrchu. To znamená, že ne všechny ASA způsobují neplodnost. Záleží nejen na množství navázaných protilátek, ale i na jejich lokalizaci, podtypu IgG, funkčním charakteru antigenu a afinitě k antigenu (Bozhedomov et al. 2015). Avšak neplodní muži jsou vysoce pozitivní proti ASA ( $\text{IgG} \geq 50 \%$ ), až 8,5× častěji než plodní muži (Bozhedomov et al. 2015).

ASA se mohou vyskytovat u párů, které trpí primární (neschopnost počít prvního potomka) i sekundární (neschopnost počít dalšího potomka) neplodností. To bylo prokázáno ve studii, která zkoumá neplodnost v centrální Indii. Z celkového počtu 109 neplodných párů, bylo ASA přítomno u 37 párů, které trpěly primární neplodností, a u 15 párů, které trpěly sekundární neplodností. Ačkoli incidence není statisticky jasná (52,12 % primární neplodnost a 39,47 % sekundární neplodnost), autoři se domnívají, že by její detekce mohla poskytnout vodítko při zjišťování etiologických faktorů (Khatoon et al. 2011). Taktéž irácká studie potvrdila přítomnost ASA u primární i sekundární neplodnosti (EL-Nahi and Fakhrildin 2009).

Protilátky snižují šance úspěšného oplodnění, na což bylo poukázáno ve studii, kde spermie byly inkubovány s protilátkami. Následná úspěšnost fertilizace byla jen 41 % oproti kontrolním 84 %, kde spermie nebyly inkubovány s protilátkami (Clarke et al. 1988). Také mají negativní vliv na časný embryonální vývoj a kvalitu embrya (Vazquez-Levin et al. 1997)

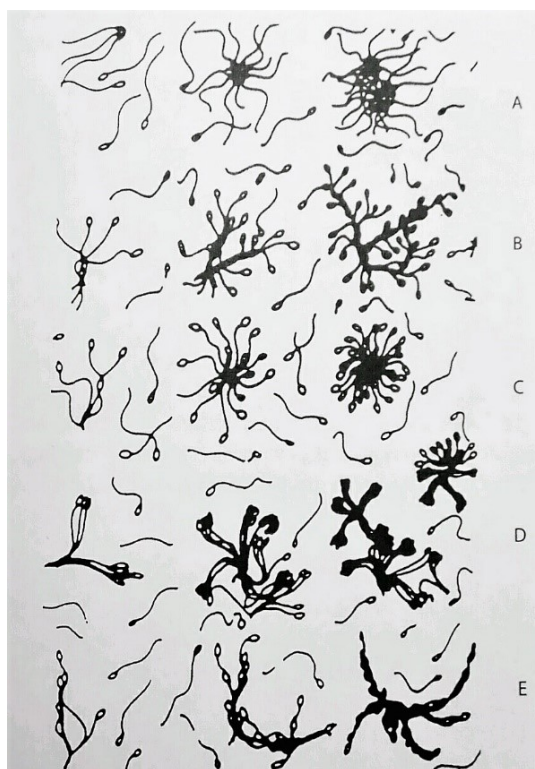
Protilátky jsou tvořeny plazmatickými buňkami a můžou se rozdělit do imunoglobulinových tříd – IgG, IgA, IgM a IgE. Současné studie ukazují, že ne každý imunoglobulin, který se váže na spermii může být nazýván ASA. Musí být namířen proti proteinu, který hraje úlohu v oplození (Clark and Naz 2013).

## 5.1 Vliv ASA na funkčnost spermií

ASA interagují s antigeny přítomnými na spermiích, čímž mohou ovlivňovat funkčnost spermií. Protilátky mohou způsobovat aglutinaci spermií, znemožňovat pohyb spermií, omezovat průnik spermií cervikálním hlenem, ovlivňovat akrozomální reakci, vazbu na zona pellucida, fúzi spermie s vajíčkem či samotný preimplantační vývoj embrya. Shetty a kol. (1999) pomocí 2D-elektroforézy objevili 98 auto i isoantigenů ze séra neplodných mužů a žen, které nebyly přítomny u plodných jedinců. Proti těmto antigenům vznikají ASA. Mnoho z těchto proteinů je zkoumáno pro možné využití jako nesteroidní imunologické antikoncepce. Mezi vhodné kandidáty patří níže popsané YLP(12) a Izumo (Naz 2014).

### 5.1.1 Aglutinace

Aglutinace je jev, kdy se vytváří shluky buněk. U spermií (proces spermaglutinace) může nastat situace, kdy se shlukují hlavičky, krčky či bičíky anebo různé kombinace (Obr. 5).



Obrázek 5: Spermaglutinace A – hlavičky, B – bičíky, C – koncové části bičíků, D, E – hlavičky i bičíky současně  
Převzato od: Ulčová-Gallova and Lošan 2013

Tento jev je způsoben tím, že se na antigen navazují protilátky. Mezi antigeny, proti kterým vznikají protilátky, jež následně způsobují aglutinaci, například patří:

- YWK-II – Antigen je lokalizován v ekvatoriálním segmentu lidské spermie (Koide et al. 2000). Bylo zjištěno, že YWK-II může mít embryotoxický potenciál (Takikawa et al. 2001). Transmembránové a cytoplasmatické domény YWKII a  $\beta$ A4-amyloidní prekursorový protein (APP) mají 70% podobnost. Proteiny této rodiny (APP) se vyskytují v placích v mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Yan et al. 1990).
- rSMP-B – Protilátky proti tomuto proteinu se váží do oblasti bičíku spermie. Blokují průnik spermie zona pellucida (Kamada et al. 1999; Takikawa et al. 2001). Takikawa a kol. (2001) také navrhuje využít této molekuly pro vývoj lidské antikoncepce.
- BS-17 – Kalpastatin – Tento antigen je primárně lokalizován na povrchu akrozomu a částečně na bičíku. Inhibice kalpastatinu vede k předčasné akrozomální reakci (Koide et al. 2000). Gen pro kalpastatin je transkribován jen na spermatidách (Wei et al. 1995).
- 80 HSA – 80kDa velký protein je přítomný na hlavičce spermie. Navázáním protilátek na antigen spermie aglutinují a následně jsou nepohyblivé. Imunohistochemickým barvením byla zjištěna přítomnost antigenu ve varlatech a nadvarlatech, což dokazuje, že protein je specifický pro spermie (Bandivdekar et al. 2001).

### 5.1.2 Akrozomální reakce

Jak bylo popsáno dříve, během akrozomální reakce splývá akrozomální a plazmatická membrána, čímž se odhalují nové receptory, které doposud byly skryté. Tím se odhalí značné množství nových antigenů. Mezi ně například patří:

- FA-1 – Monoklonální protilátky proti tomuto antigenu blokují akrozomální reakci, kapacitaci a snižují účinnost vazby spermie-ZP (Kaplan and Naz 1992). FA-1 interaguje se ZP3 receptorem (Naz et al. 1991), což je primární receptor pro vznik vazby mezi spermií a oocytem. Tento antigen je však schopen uvolnit protilátky ze spermií, čímž umožňuje podstoupit AR až u 78 % vzorků spermií (Menge et al. 1999).
- SPRASA – Protilátky proti tomuto antigenu jsou detekovány výhradně u mužů trpících neplodností. SPRASA je lokalizován na přední části hlavičky spermie a předpokládá se, že je lokalizován, stejně jako CD46, na vnitřní akrozomální membráně (Chiu et al. 2004). Bylo zjištěno, že protilátky proti tomuto antigenu neovlivňují pohyblivost spermií, ale značně snižují schopnost spermie se navázat na oolemu (Wagner et al. 2015).



- CD46 – Nejenže je CD46 membránový regulátor komplementu, ale také se účastní vazby spermie-oocyt. Vyskytuje se na vnitřní membráně akrozomu, a tudíž se jeho množství zvyšuje až s postupující AR (Purcell et al. 1990). Vazbou protilátek na CD46 se lokálně aktivuje komplement, který inhibuje hybnost spermií (Mizuno et al. 2007).

### 5.1.3 Vazba na zona pellucida

Zona pellucida (ZP) je glykoproteinový obal kolem oocytu. Klíčovým receptorem pro vznik primární vazby spermie na vajíčko jsou proteiny ZP3. Primární vazba indukuje akrozomální reakci a dochází k sekundární vazbě na ZP2. Mezi antigeny ovlivňující vznik vazby například patří:

- FA-1, který byl popsán již u akrozomální reakce.
- YLP(12) – Peptid YLP(12) specificky rozpoznává protein ZP3, což naznačuje, že je důležitý pro úspěšné rozpoznání ZP3 a vazbu na něj. Je lokalizován v akrozomálním úseku, spojovacím oddílu a bičíku spermie. Antigen vázající fragmenty (Fab) nezpůsobuje aglutinaci či neovlivňuje hybnost spermie, ale značně inhibuje vazbu spermie-ZP (Naz et al. 2000).

Protilátky proti těmto antigenům byly detekovány u jedinců, kteří měli problémy s fertilitou (Naz and Chauhan 2001; Williams et al. 2008).

### 5.1.4 Vazba na oolemu a následná fúze buněk

Několik proteinů se účastní vazby spermie-oocyt a jejich vzájemné fúze. Je známo, že lidská spermie kontaktuje oocyt svou ekvatoriální částí, tudíž proteiny důležité pro vznik vazby spermie oocyt jsou lokalizovány právě v ekvatoriální části. Mezi ně například patří:

- GP20 – Po kapacitaci je GP20 jediným přítomným sialoglykoproteinem na povrchu spermie (Focarelli et al. 1995). Tento antigen není exprimován v testes, ale v epididymu a je také přítomný v seminální plazmě (Focarelli et al. 1998). Anti-GP20 inhibují penetraci spermií skrz oocyt bez ZP u křečků (Focarelli et al. 1998).
- ESP – Protilátky proti proteinu ekvatoriálního segmentu (ESP) inhibují vazbu spermie-oocyt a následnou fúzi buněk. Tento fakt Wolkowicz a kol. (2008) vysvětlují tak, že ESP je obzvláště důležitý pro pozdní kroky vedoucí k oplodnění. ESP se také účastní těsné vazby spermie-oocyt.
- Izumo – Izumo je prvním membránovým proteinem spermie, u kterého bylo prokázáno, že je esenciální pro fúzi buněk. Inoue a kol. (2005) objevili tento protein v roce 2004. Pomocí Izumo<sup>-/-</sup> myši zjistili, že spermie mají normální vzhled, jsou schopny penetrovat

skrz ZP, ale nejsou schopny fúzovat s oocytem. To samé zjistili i u lidských spermií. Izumo je tkáňově specifický protein. Vyskytuje se jen na spermiích a ve varlatech. Na spermiích je detekovatelný až po AR (Inoue et al. 2005). Izumo 1 a 2 tvoří integrální část transmembránového komplexu, ale i proti těmto podjednotkám byly detekovány protilátky v séru neplodných žen (Clark and Naz 2013).

## 5.2 ASA u žen

Je jasné, že u zdravých plodných žen nevznikají ASA ve velkém množství. Pohlavní trakt ženy má vyvinuté imunosupresivní mechanismy k ochraně pohlavního traktu, přestože nemá imunologickou bariéru. Po ejakulaci se značné množství antigenů dostává do kontaktu s epitelem ženského pohlavního traktu, peritoneem, či gastrointestinálním traktem. U některých žen ASA mohou vzniknout při narušené imunitě, porušené mukózní integritě, či epitelu (Marshburn and Kutteh 1994) a následně reagovat se spermiemi.

Existuje několik hypotéz, proč ASA u žen vznikají. Je možné, že antigeny spermií zkříženě reagují s antigeny některých mikroorganismů. Tudíž se předpokládá, že infekce genitálního traktu mohou vést ke vzniku ASA (Cunningham et al. 1991). Další hypotéza, která vyplývá z pozorování, je, že pokud partner má ASA v semeni, tak je větší pravděpodobnost vzniku ASA i u žen (Witkin and Chaudhry 1989). Také je pozorován vznik protilátek u lidí, kteří již trpí autoimunitní chorobou – například ulcerózní kolitidou (Dimitrova et al. 2005; Shiraishi et al. 2009)

ASA je detekovatelné v krevním séru, cervikálním hlenu, peritoneální a folikulární tekutině. V séru se nejčastěji vyskytují imunoglobuliny třídy IgG a naopak v genitálním traktu převážně IgA (Marshburn and Kutteh 1994). V séru se protilátky vyskytují u žen i u mužů. Například v něm byly detekovány výše zmíněné protilátky proti FA-1 a YLP(12) (Williams et al. 2008). Ve studii Sterna a kol. (1992) bylo zjištěno, že nekoreluje množství ASA mezi cervikálním hlenem a sérem. Kapoor a kol. (1999) studovali 40 neplodných párů, přičemž ASA bylo detekováno u 30 % párů, 25 % tvořily ženy a 10 % muži (z celkového počtu). Nejčastěji pozitivní na ASA bylo z 58 % sérum žen, poté 33 % mužské sérum a z 25 % cervikální hlen. Ve studii Mahdi a kol. (2011) bylo sledováno 45 neplodných žen z nichž 62 % bylo pozitivních na ASA a ve 43 % případů spermie v cervikovaginálním sekretu aglutinovali. Naopak výsledky jiných autorů ukazují, že ASA se v cervikálním hlenu vyskytují mnohem častěji, než udávají výše zmiňovaní autoři. Například ve studii Ulčové-Gallové a kol. (1997), mělo téměř 85 % pacientek pozitivní test vůči IgA.

### 5.3 ASA u mužů

Protilátky proti spermiím jsou sekretovány B lymfocyty. Stejně jako u žen mohou být detekovány z krevního séra, a navíc jsou přítomny v seminální plasmě. Je obvyklé, že když muži mají ASA přítomné v semenné plasmě, tak je také detekováno v séru (Andreou et al. 1995).

Protilátky proti spermiím vznikají kontaktem antigenu spermie s imunokompetentní buňkou, mukózním hlenem a celkovým kontaktem s imunitním systémem. Mezi rizikové faktory, pro vznik ASA u mužů, patří abnormality hematotestikulární bariéry, úrazy reprodukčního traktu, vazektomie a jiné operace, či různé infekce. Avšak jen obstrukce mužského reprodukčního traktu (zvláště vazektomie) je přijímána jako jediná příčina, při které je následně detekován zvýšený počet ASA v ejakulátu (Lee et al. 2009; Marconi et al. 2008). Pacienti po vazektomii následně trpí obstrukční azoospermií. U těchto pacientů byl detekován v 88 % případů výskyt ASA (Lee et al. 2009). Tito muži mají v ejakulátu značné množství IgG i IgA na povrchu spermií ( $\geq 50\%$ ) oproti kontrolní skupině (Marconi et al. 2008). Marconi a kol. také prokazují, že chronické záněty a infekce seminálního traktu nemají vliv na vznik ASA. Ale v jiné studii bylo zjištěno, že muži s genitální infekcí mají ve svém spermatu více protilátek reagujících se spermiemi než zdraví muži (Witkin and Toth 1983). V další studii navrhuji, že by chronické infekce mužského pohlavního traktu mohly souviset se vznikem ASA (Martinez-Prado and Camejo Bermudez 2010). Například u chronické prostatitidy jsou pacienti výrazně pozitivní na ASA oproti kontrolní skupině (Jiang et al. 2016). Avšak tento fakt neznámá, že by vždy pacienti s chronickou prostatitidou měli problémy s fertilitou.

K rizikovým faktorům pro vznik ASA patří úrazy varlat a chirurgické zákroky. Kukadia a kol. (1996) studovali 8 pacientů po zranění varlat. Jen jeden pacient měl pozitivní test proti ASA, ale nesplňoval klinická kritéria definice ASA dané laboratoře. Tímto výzkumem nebyl prokázán vliv úrazů testes na vznik ASA. To samé bylo zjištěno i u pacientů, kteří měli torzi varlete a následně byli operováni (Arap et al. 2007).

Výsledky v dosavadních studiích nejsou jednotné – nijak nepotvrzují, ani nevyvrací výše vyjmenované faktory, které by měly ovlivňovat vznik ASA. Proto je důležité pokračovat v dalším výzkumu, aby tato problematika byla ujasněna a bylo možné se právě těmito faktory, pokud možno, vyhýbat.

## **6 Léčba imunologické neplodnosti**

### **6.1 Diagnostika**

Screening u neplodného páru by se měl provést v případě, pokud žena neotěhotněla do roka při pravidelném nechráněném sexu. Prověřování může být provedeno i dříve, pokud je znám u páru rizikový faktor způsobující neplodnost. V případě mužské neplodnosti, by mělo úvodní testování zahrnovat dvě důkladné analýzy semene, přičemž analýzy by se měly provádět s časovým odstupem minimálně 1 měsíce. Specializované testy semene nejsou vyžadovány, ale jsou vhodné při neobjasněné infertilitě. Takovéto testy zahrnují určení množství leukocytů v semeni, zjištění přítomnosti protilátek, určení pohyblivosti spermií či interakci spermií s cervikálním hlenem (Sharlip et al. 2002).

Mezi nejznámější testy pro detekci protilátek jsou MAR test a IBT test. Díky těmto testům se dá určit třída imunoglobulinu a množství navázaných protilátek na povrchu spermie, ale nedá se s nimi určit specifický antigen. Testy MAR a IBT jsou snadné, finančně nenáročné a rychlé. Světová zdravotnická organizace je doporučila jako standardní laboratorní metodu pro určení přítomnosti ASA (WHO 1999). Specifický antigen se může určit například pomocí monoklonálních protilátek a imunofluorescence.

#### **6.1.1 MAR test – Test smíšené antiglobulinové reakce**

Čerstvý ejakulát je smíchán s latexovými částicemi nebo ovčími erytrocyty. Přidáním imunospecifického IgG antiséra cíleného proti lidským proteinům se vytváří smíšené aglutinace mezi částicemi a pohyblivými spermiemi jako důkaz navázání IgG protilátek na spermie. Diagnóza imunologické infertility je pravděpodobná, pokud  $\geq 40\%$  pohyblivých spermií naváže tyto částice. Suspektní, z imunologicky podmíněné infertility, je výskyt 10 – 40 % pohyblivých spermií s těmito adhezemi (URL 1).

#### **6.1.2 Immunobead test – IBT test**

Tímto testem lze prokázat protilátky na povrchu spermií. Immunobeads jsou kuličky z polyakrylamidu, které kovalentně váží antihumánní králičí imunoglobulin. V tomto testu lze stanovit současně podíl IgG a IgA. Spermie jsou opakovaným centrifugováním odděleny od seminální plazmy a resuspendovány v nárazníkovém roztoku. Suspenze spermií je smíchána s immunobead suspenzí a reakce je sledována v mikroskopu s fázovým kontrastem pod 400× zvětšením. Během pohybu spermií prostředím suspenze, dochází u spermií s povrchovými

protilátkami k navázání na immunobeads. Spočítá se podíl spermií s povrchovými protilátkami. Pomocí dvou různých immunobeads lze rozlišit třídy IgA a IgG (URL 1).

## 6.2 Léčba

Pokud je zjištěna přítomnost ASA u neplodného páru, doporučuje se pacientům kondomová terapie. Cílem chráněného pohlavního styku pomocí prezervativu je zabránit kontaktu rozpustných, povrchových antigenů spermií s buňkami reprodukčního traktu. Léčba je obvykle ordinována na 3 – 6, někdy také 12 měsíců. Protilátky během této doby poklesávají na minimální hladiny. Avšak výsledky této léčby nejsou povzbudivé, proto je tato léčba kombinována s dalšími terapiemi (Ulčová-Gallová and Lošan 2013). K utlumení imunitní reakce je využívána léčba kortikosteroidy (například prednison a hydrokortison), které jsou podávány orálně i lokálně na ektocervix (Ulcova-Gallova et al. 2000).

Při léčbě by si lékař infertilního páru měl položit tyto otázky: 1) Je problém na straně partnera? 2) Jak moc jsou imunologické abnormality významné? 3) Existuje příčina této patologie? 4) Může být tato příčina léčena? 5) Měl by pár podstoupit asistovanou reprodukci *in vitro* fertilizaci (IVF) nebo dokonce intracytoplasmatickou injekci spermií (ICSI)? 6) Mohou biomarkery předpovědět úspěšnou léčbu (Wang and Swerdloff 2014)? Při zjišťování příčin neplodnosti je také potřeba zjistit obecný zdravotní stav (kouření, obezita, chronická onemocnění, genetické testování). Například studie EL-Nahi a Fakhrildina (2009) poukazuje na to, že kouření má negativní vliv na imunitní neplodnost. Také věk by se mohl pokládat za rizikový faktor. Amjad a kol. (2007) zjistili, že se pravděpodobně s vyšším věkem zvyšuje prevalence ASA, bez ohledu na pohlaví.

První volbou při fertilizaci, v případě přítomnosti ASA je metoda ISCI (Lombardo et al. 2001), jelikož má vyšší úspěšnost fertilizace. U této procedury je jen jedna spermie injikována do cytoplasmy oocyty. Poté je časné embryo přeneseno zpět do dělohy. Ve studii Lähteenmäki a kol. (1995) bylo léčeno 29 infertilních párů – ASA pozitivních. 22 z nich mělo slabou fertilizační schopnost (6 %) při předchozím IVF. Užitím metody ISCI se fertilizační schopnost zvýšila na 79 %, což byla podobná hodnota jako u kontrolní ASA negativní skupiny (68 %). Naopak u ASA pozitivních pacientů, 46 % těhotenství skončilo potratem v prvním trimestru, oproti žádnému potratu v kontrolní skupině. Z toho vyplývá, že při ISCI je vysoká pravděpodobnost otěhotnění, avšak také vysoká pravděpodobnost spontánního abortu.

Navázané protilátky na spermiích je těžké odstranit, dokonce i pomocí invazivních a nákladných technologií. Protilátky musí mít nízkou afinitu k antigenu, aby mohly být eluovány pouhým promytím (Naz 2009).

Mezi jiné, neméně perspektivní léčebné metody, patří odstraňování přecitlivělosti k rozpustným antigenům spermií nebo zásah přímo proti vytvořené protilátce její protiprotilátkou (idiotyp-antiidiotypové protilátky). Řada dalších zásahových procesů v oblasti reprodukční medicíny nepřekročila zatím hranice pokusu v laboratoři (Ulčová-Gallová and Lošan 2013).

## 7 Závěr

V současné době neplodnost postihuje 15 % párů toužících po dítěti. Většina párů považuje za samozřejmost mít vlastní dítě, avšak v poslední době neplodných párů přibývá. A to v souvislosti s odkládáním mateřství, vlivem okolního prostředí (například genotoxické faktory), životním stylem (kouření, konzumace alkoholu, obezita, neléčení zánětlivých onemocnění), možná i zvyšující se alergickou reaktivitou a větším množstvím autoimunitních chorob, přičemž již bylo zjištěno, že autoimunitní onemocnění zvyšují pravděpodobnost vzniku ASA. Zmíněné rizikové faktory a mnoho dalších snižuje šance na bezproblémové otěhotnění a následný vývoj plodu.

Neplodnost neznamena jen problém s početím dítěte, ale také negativně ovlivňuje psychiku páru (Datta et al. 2016), především ženy a má negativní vliv na samotný vztah a soužití páru.

Jednou z mnoha příčin neplodnosti je vznik protilátek proti spermiím, které vznikají následkem vystavení antigenů spermie imunitnímu systému následkem narušení imunoregulačních mechanismů. Vzniklé protilátky se vyskytují u žen i mužů a mají negativní vliv na funkčnost spermie, čímž se snižuje pravděpodobnost fertilizace oocyty. Je známo mnoho proteinů vyskytujících se na povrchu spermie, na které se váží dané protilátky, čímž se snižuje šance úspěšného oplodnění. Protilátky mohou způsobovat aglutinaci spermií (80 HSA) (Bandivdekar et al. 2001), předčasnou akrozomální reakci (BS-17) (Koide et al. 2000), či akrozomální reakci blokovat (FA-1) (Kaplan and Naz 1992), nebo blokovat průnik spermie zona pellucida (rSMP-B) (Kamada et al. 1999; Takikawa et al. 2001) a dále narušovat vazbu spermie-oocyt a jejich vzájemnou fúzi (např. SPRASA, CD46, GP20 a Izumo) (Clark and Naz 2013; Focarelli et al. 1998; Mizuno et al. 2007; Wagner et al. 2015). Pro detekci přítomnosti ASA je standardní laboratorní metodou MAR test a IBT test (WHO 1999). Nejběžnější léčbou je podávání imunosupresiv spolu s metodou ICSI (Lombardo et al. 2001; Ulčová-Gallová and Lošan 2013).

Zatím neexistuje léčba, která by cílila na specifické protilátky, avšak vědci zkoumají možné využití monoklonálních či idiotyp-antiidiotypových protilátek k léčbě neplodnosti vzniklé tvorbou ASA. Prozatím žádná specifická léčba není, potlačuje se vznik protilátek a reaktivita imunitního systému. Taktéž se zkoumá možné využití známých antigenů k přípravě nehormonální imunologické antikoncepce.

Je třeba se i nadále zabývat touto problematikou, protože patofyziologie vzniku ASA není příliš jasná. Bylo by vhodné provést další studie, protože doposud se názory vědců i výsledky testů ohledně ASA liší. Některé studie tvrdí, že nemají vliv na plodnost, jiné naopak ukazují

sníženou fertilizační schopnost spermií. Možná z tohoto důvodu se běžně po světě nedělá testování proti ASA, což také mohlo vytvořit nedostatek údajů v současné literatuře (Amjad et al. 2007). Taktéž by bylo vhodné, aby laboratoře zabývající se touto problematikou sjednotily definice a metody pro určování ASA, díky čemuž by mohly být výsledky jednotnější.



## Zdroje:

- Agarwal A, and Allamaneni SSR. 2005. Disruption of Spermatogenesis by the Cancer Disease Process. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005(34):9-12.
- Amjad H, Nazrul I, Subhas A, and Amos M. 2007. The prevalence of circulating anti sperm antibody (ASA) in infertile population representing of all etiologies. *Middle East Fertility Society Journal* 12(1):27-30.
- Andreou E, Mahmoud A, Vermeulen L, Schoonjans F, and Comhaire F. 1995. Comparison of different methods for investigation of antisperm antibodies on spermatozoa, in seminal plasma and in serum. *Human Reproduction* 10(1):125-131.
- Apa DD, Cayan S, Polat A, and Akbay E. 2002. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Archives of Andrology* 48(5):337-344.
- Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, and Srougi M. 2007. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *Journal of Andrology* 28(4):528-532.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research Series B-Biological Sciences* 4(4):581-&.
- Austin CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170(4321):326-326.
- Bandivdekar AH, Vernekar VJ, Moodbidri SB, and Koide SS. 2001. Characterization of 80 kDa human sperm antigen responsible for immunoinfertility. *American Journal of Reproductive Immunology* 45(1):28-34.
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, and Duke RC. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377(6550):630-632.
- Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, and Hershlag A. 1993. Head specific manose ligand-receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation - associated membrane cholesterol loss. *Human Reproduction* 8(12):2141-2154.
- Bigelow JL, Dunson DB, Stanford JB, Ecohard R, Gnoth C, and Colombo B. 2004. Mucus observations in the fertile window: a better predictor of conception than timing of intercourse. *Human Reproduction* 19(4):889-892.
- Bohring C, and Krause W. 2003. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity - The value of proteomic analysis. *Human Reproduction* 18(5):915-924.
- Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, and Cone RA. 1999. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and Immunity* 67(10):5170-5175.
- Bozhedomov VA, Nikolaeva MA, Ushakova IV, Lipatova NA, Bozhedomova GE, and Sukhikh GT. 2015. Functional deficit of sperm and fertility impairment in men with antisperm antibodies. *Journal of Reproductive Immunology* 112:95-101.
- Capkova J, Kubatova A, Ded L, Tepla O, and Peknicova J. 2016. Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. *Asian Journal of Andrology* 18(1):108-113.
- Carruba G, D'Agostino P, Miele M, Calabro M, Barbera C, Di Bella G, Milano S, Ferlazzo V, Caruso R, La Rosa M et al. . 2003. Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 90(1):187-196.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168(4277):697-698.
- Chemes H. 1986. The phagocytic function of Sertoli cells - A morphological, biochemical, and endocrinologic study of lysosomes and acid-phosphatase in the rat testis. *Endocrinology* 119(4):1673-1681.
- Chiu WWC, Erikson EKL, Sole CA, Shelling AN, and Chamley LW. 2004. SPRASA, a novel sperm protein involved in immune-mediated infertility. *Human Reproduction* 19(2):243-249.
- Clark GF, and Schust DJ. 2013. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. *Frontiers in Immunology* 4.
- Clark S, and Naz RK. 2013. Presence and Incidence of Izumo Antibodies in Sera of Immunoinfertile Women and Men. *American Journal of Reproductive Immunology* 69(3):256-263.

- Clarke GN, Hyne RV, Duplessis Y, and Johnston WIH. 1988. Sperm antibodies and human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 49(6):1018-1025.
- Collins JA, Burrows EA, Yeo J, and Younglai EV. 1993. Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Human Reproduction* 8(4):592-598.
- Correa CHM, Mattos ALG, and Ferrari AN. 2001. In situ variation of cervical mucus pH during exposure to atmospheric air. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34(6):767-770.
- Cuasnicú PS, Cohen DJ, Ellerman DA, Busso D, Da Ros VG, and Morgenfeld MM. 2002. Changes in Specific Sperm Proteins During Epididymal Maturation. In: Robaire B, and Hinton BT, editors. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and the Vas Deferens*. Boston, MA: Springer US. p 389-403.
- Cunningham DS, Fulgham DL, Rayl DL, Hansen KA, and Alexander NJ. 1991. Antisperm antibodies to sperm surface antigens in women with genital tract infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 164(3):791-796.
- Cyr DG, Robaire B, and Hermo L. 1995. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microscopy Research and Technique* 30(1):54-66.
- Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ, and Breton S. 2011. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141(5):653-663.
- Datta J, Palmer MJ, Tanton C, Gibson LJ, Jones KG, Macdowall W, Glasier A, Sonnenberg P, Field N, Mercer CH et al. . 2016. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction* 31(9):2108-2118.
- De Cesaris P, Filippini A, Cervelli C, Riccioli A, Muci S, Starace G, Stefanini M, and Ziparo E. 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro - Biological effects on lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186(3):1639-1646.
- De Jonge C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update* 11(3):205-214.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, and Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human Reproduction* 13:1-8.
- Dimitrova D, Kalaydjiev S, Mendizova A, Piryova E, and Nakov L. 2005. Circulating antibodies to human spermatozoa in patients with ulcerative colitis. *Fertility and Sterility* 84(5):1533-1535.
- Dube E, Hermo L, Chan PTK, and Cyr DG. 2008. Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biology of Reproduction* 78(2):342-351.
- Dube E, Hermo L, Chan PTK, and Cyr DG. 2010. Alterations in the Human Blood-Epididymis Barrier in Obstructive Azoospermia and the Development of Novel Epididymal Cell Lines from Infertile Men. *Biology of Reproduction* 83(4):584-596.
- Dym M, and Romrell LJ. 1975. Intraepithelial lymphocytes in male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *Journal of Reproduction and Fertility* 42(1):1-&
- EL-Nahi SFH, and Fakhrildin M-BM-R. 2009. Detection of antisperm antibodies in sera of Iraqi males and females and their role in fertilizing capacity. *Iraqi Journal of medical sciences* 7(3):19-23
- Fallarino F, Luca G, Calvitti M, Mancuso F, Nastruzzi C, Fioretti MC, Grohmann U, Becchetti E, Burgevin A, Kratzer R et al. . 2009. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone. *Journal of Experimental Medicine* 206(11):2511-2526.
- Fawcett DW, Neaves WB, and Flores MN. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatics and organization of interstitial tissue of mammalian testis. *Biology of Reproduction* 9(5):500-532.
- Fijak M, and Meinhardt A. 2006. The testis in immune privilege. *Immunological Reviews* 213:66-81.
- Fijak M, Schneider E, Klug J, Bhushan S, Hackstein H, Schuler G, Wygrecka M, Gromoll J, and Meinhardt A. 2011. Testosterone Replacement Effectively Inhibits the Development of Experimental Autoimmune Orchitis in Rats: Evidence for a Direct Role of Testosterone on Regulatory T Cell Expansion. *Journal of Immunology* 186(9):5162-5172.
- Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, Scibona M, Fabris FM, Francavilla F, Francavilla S, Della Giovampaola C, and Rosati F. 1998. Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialylglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal

- transit which is necessary to penetrate zona-free hamster eggs. *Molecular Human Reproduction* 4(2):119-125.
- Focarelli R, Giuffrida A, and Rosati F. 1995. Changes in the sialoglycoconjugate distribution on the human sperm surface during in-vitro capacitation - Partial purification of 20 kDa sialoglycoprotein of capacitated spermatozoa. *Human Reproduction* 10(10):2755-2759.
- Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Kohn FM, Vogt HJ, and Mayerhofer A. 2002a. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertility and Sterility* 78(2):298-306.
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, and Mayerhofer A. 2002b. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR $\gamma$ : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. p 15072-15077.
- Gadella BM, and Visconti PE. 2006. Regulation of capacitation. The sperm cell Cambridge University Press, Cambridge, UK:134-169.
- Gilbert SF. 2000. Developmental biology. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xviii, 749 p. p.
- Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, and Wira CR. 1997. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: Comparison of Fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *American Journal of Reproductive Immunology* 38(5):350-359.
- Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9(4):411-416.
- Hooper P, Smythe E, Richards RC, Howard CV, Lynch RV, and Lewisjones DI. 1995. Total number of immunocompetent cells in the normal rat epididymis and after vasectomy. *Journal of Reproduction and Fertility* 104(2):193-198.
- Hunter D, Anand-Ivell R, Danner S, and Ivell R. 2012. Models of in vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2(1):32-43.
- Hussein MR, Abou-Deif ES, Bedaiwy MA, Said TM, Mustafa MG, Nada E, Ezat A, and Agarwal A. 2005. Phenotypic characterization of the immune and mast cell infiltrates in the human testis shows normal and abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility* 83(5):1447-1453.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, and Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *Journal of Clinical Investigation* 120(4):984-994.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, and Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434(7030):234-238.
- Jiang YM, Cui D, Du YF, Lu J, Yang L, Li JM, Zhang J, and Bai XJ. 2016. Association of anti-sperm antibodies with chronic prostatitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Reproductive Immunology* 118:85-91.
- Johansson EL, Rudin A, Wassen L, and Holmgren J. 1999. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology* 96(2):272-277.
- Jones R. 1999. Some misconceptions of the human epididymis. In: Glover TD BC, editor. *Male Fertility and Infertility*. Cambridge: Cambridge University Press. p 85–104.
- Kamada M, Yamamoto S, Takikawa M, Kunimi K, Maegawa M, Futaki S, Ohmoto Y, Aono T, and Koide SS. 1999. Identification of the human sperm protein that interacts with sperm-immobilizing antibodies in the sera of infertile women. *Fertility and Sterility* 72(4):691-695.
- Kaplan P, and Naz RK. 1992. The fertilization antigen-1 does not have proteolytic/acrosin activity, but its monoclonal antibody inhibits sperm capacitation and acrosome reaction. *Fertility and Sterility* 58(2):396-402.
- Kapoor A, Verma SK, and Talib VH. 1999. Immunological assessment of infertility by estimation of antisperm antibodies in infertile couples. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 42(1):37-43.
- Kern S, Robertson SA, Mau VJ, and Maddocks S. 1995. Cytokine secretion b macrophages in the rat testis. *Biology of Reproduction* 53(6):1407-1416.
- Khatoon M, Chaudhari AR, Singh R, and Prajapati S. 2011. Antisperm Antibodies in Primary and Secondary Infertile Couples of Central India. *Biomedical Research-India* 22(3):295-297.
- Kho EM, McCowan LME, North RA, Roberts CT, Chan E, Black MA, Taylor RS, Dekker GA, and Consortium S. 2009. Duration of sexual relationship and its effect on preeclampsia and small for gestational age perinatal outcome. *Journal of Reproductive Immunology* 82(1):66-73.

- Koide SS, Wang LF, and Kamada M. 2000. Antisperm antibodies associated with infertility: Properties and encoding genes of target antigens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224(3):123-132.
- Kukadia AN, Ercole CJ, Gleich P, Hensleigh H, and Pryor JL. 1996. Testicular trauma: Potential impact on reproductive function. *Journal of Urology* 156(5):1643-1646.
- Lahteenmaki A, Reima I, and Hovatta O. 1995. Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 10(11):2824-2828.
- Lee HM, Oh BC, Lim DP, Lee DS, Cho JJ, Lee G, and Lee JR. 2007. Role of complement regulatory proteins in the survival of murine allo-transplanted Sertoli cells. *Journal of Korean Medical Science* 22(2):277-282.
- Lee R, Goldstein M, Ullery BW, Ehrlich J, Soares M, Razzano RA, Herman MP, Callahan MA, Li PS, Schlegel PN et al. . 2009. Value of Serum Antisperm Antibodies in Diagnosing Obstructive Azoospermia. *Journal of Urology* 181(1):264-269.
- Lee SK, Kim CJ, Kim D-J, and Kang J-h. 2015. Immune Cells in the Female Reproductive Tract. *Immune Network* 15(1):16-26.
- Lombardo F, Gandini L, Dondero F, and Lenzi A. 2001. Immunology and immunopathology of the male genital tract - Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 7(5):450-456.
- Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J et al. . 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442(7106):997-1002.
- Mahdi BM, Salih WH, Caitano AE, Kadhum BM, and Ibrahim DS. 2011. Frequency of Antisperm Antibodies in Infertile Women. *Journal of Reproduction & Infertility* 12(4):261-266.
- Marconi M, Nowotny A, Pantke P, Diemer T, and Weidner W. 2008. Antisperm antibodies detected by mixed agglutination reaction and immunobead test are not associated with chronic inflammation and infection of the seminal tract. *Andrologia* 40(4):227-234.
- Marshburn PB, and Kutteh WH. 1994. The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertility and Sterility* 61(5):799-811.
- Martinez-Prado E, and Camejo Bermudez MI. 2010. Expression of IL-6, IL-8, TNF-alpha, IL-10, HSP-60, Anti-HSP-60 Antibodies, and Anti-sperm Antibodies, in Semen of Men with Leukocytes and/or Bacteria. *American Journal of Reproductive Immunology* 63(3):233-243.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, and Stevens GA. 2012. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *Plos Medicine* 9(12):12.
- Menge AC, Christman GM, Ohl DA, and Naz RK. 1999. Fertilization antigen-1 removes antisperm autoantibodies from spermatozoa of infertile men and results in increased rates of acrosome reaction. *Fertility and Sterility* 71(2):256-260.
- Menge AC, Medley NE, Mangione CM, and Dietrich JW. 1982. The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility. *Fertility and Sterility* 38(4):439-446.
- Mizuno M, Harris CL, and Morgan BP. 2007. Immunization with autologous CD46 generates a strong autoantibody response in rats that targets spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* 73(2):135-147.
- Moghissi K, and Syner F. 1976. Cyclic changes in the amount and sialic acid of cervical mucus. *International Journal of Fertility* 21:246-250.
- Mullaney BP, and Skinner MK. 1993. Transforming growth-factor beta (beta-1, beta-2, and beta-3) gene expression and activation during pubertal development of the seminiferous tubule - Potential role at the onset of spermatogenesis. *Molecular Endocrinology* 7(1):67-76.
- Naz RK. 2004. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: Novel perspectives. *American Journal of Reproductive Immunology* 51(5):390-397.
- Naz RK. 2009. Treatment of Immune Infertility. In: Krause WKH, and Naz RK, editors. *Immune Infertility: The Impact of Immune Reactions on Human Infertility*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p 185-194.
- Naz RK. 2014. Vaccine for human contraception targeting sperm Izumo protein and YLP12 dodecamer peptide. *Protein Science* 23(7):857-868.

- Naz RK, and Chauhan SC. 2001. Presence of antibodies to sperm YLP12 synthetic peptide in sera and seminal plasma of immunoinfertile men. *Molecular Human Reproduction* 7(1):21-26.
- Naz RK, Sacco AG, and Yurewicz EC. 1991. Human spermatozoal FA-1 binds with ZP3 of porcine zona pellucida. *Journal of Reproductive Immunology* 20(1):43-58.
- Naz RK, Zhu XL, and Kadam AL. 2000. Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocontraception. *Biology of Reproduction* 62(2):318-324.
- Nocera M, and Chu TM. 1995. Characterization of latent transforming growth-factor-beta from human seminal plasma. *American Journal of Reproductive Immunology* 33(4):282-291.
- Nouza K, Madar J, and Nouza M. 2007. Imunologie a imunopatologie reprodukčního procesu I. Neplodnost (Sterilita). *Alergie* 2:135 - 141.
- Pandya IJ, and Cohen J. 1985. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertility and Sterility* 43(3):417-421.
- Politch JA, Tucker L, Bowman FP, and Anderson DJ. 2007. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Human Reproduction* 22(11):2928-2935.
- Pollanen P, and Niemi M. 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *International Journal of Andrology* 10(1):37-42.
- Purcell DFJ, McKenzie IFC, Lublin DM, Johnson PM, Atkinson JP, Oglesby TJ, and Deacon NJ. 1990. The human cell-surface glycoproteins HULY-M5, membrane cofactor protein (MCP) of the complement system, and trophoblast leukocyte - common (TLX) antigen, are CD46. *Immunology* 70(2):155-161.
- Rival C, Guazzone VA, von Wulffen W, Hackstein H, Schneider E, Lustig L, Meinhardt A, and Fijak M. 2007. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. *Molecular Human Reproduction* 13(12):853-861.
- Rival C, Lustig L, Iosub R, Guazzone VA, Schneider E, Meinhardt A, and Fijak M. 2006. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell and Tissue Research* 324(2):311-318.
- Robertson SA. 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research* 322(1):43-52.
- Robertson SA, Allanson M, and Mau VJ. 1998. Molecular regulation of uterine leukocyte recruitment during early pregnancy in the mouse. *Placenta* 19(Supplement 1):101-119.
- Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, and Robertson SA. 2012. Seminal Fluid Induces Leukocyte Recruitment and Cytokine and Chemokine mRNA Expression in the Human Cervix after Coitus. *Journal of Immunology* 188(5):2445-2454.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD et al. . 2002. Best practice policies for male infertility. *Fertility and Sterility* 77(5):873-882.
- Shetty J, Naaby-Hansen S, Shibahara H, Bronson R, Flickinger CJ, and Herr JC. 1999. Human sperm proteome: Immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biology of Reproduction* 61(1):61-69.
- Shinagawa T, Huynh LM, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Kwak HG, Dohmae N, Noguchi J, and Ishii S. 2015. Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development* 142(7):1287-1292.
- Shiraishi Y, Shibahara H, Koriyama J, Hirano Y, Okazaki H, Minota S, and Suzuki M. 2009. Incidence of Antisperm Antibodies in Males with Systemic Autoimmune Diseases. *American Journal of Reproductive Immunology* 61(3):183-189.
- Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Hill E, Pittet MJ, and Da Silva N. 2014. Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2(5):755-762.
- Stern JE, Dixon PM, Manganiello PD, and Brinckjohnsen T. 1992. Antisperm antibodies in women - variability in antibody levels in serum, mucucus, and peritoneal fluid. *Fertility and Sterility* 58(5):950-958.

- Takikawa M, Kamada M, Maegawa M, Yamano S, Irahara M, Aono T, Futaki S, Ohmoto Y, and Koide SS. 2001. Evaluation of two sperm antigens, rSMP-B and YWK-II, as targets for immunocontraception. *Zygote* 9(2):145-151.
- Tremellen KP, Seamark RF, and Robertson SA. 1998. Seminal transforming growth factor beta(1) stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biology of Reproduction* 58(5):1217-1225.
- Tremellen KP, Valbuena D, Landeras J, Ballesteros A, Martinez J, Mendoza S, Norman RJ, Robertson SA, and Simon C. 2000. The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Human Reproduction* 15(12):2653-2658.
- Ulcova-Gallova Z. 1997. Ten-year experience with antispermatzoal activity in ovulatory cervical mucus and local hydrocortisone treatment. *American Journal of Reproductive Immunology* 38(3):231-234.
- Ulcova-Gallova Z. 2010. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *Journal of Reproductive Immunology* 86(2):115-121.
- Ulcova-Gallova Z, Bouse V, Rokyta Z, and Krizanovska K. 2000. Effect of corticosteroids on sperm antibody concentration in different biological fluids and on pregnancy outcome in immunologic infertility. *Zentralblatt für Gynäkologie*. p 495-499.
- Ulčová-Gallová Z, and Lošan P. 2013. Neplodnost - Útok imunity. České Budějovice: Grada Publishing, a.s. 152 p.
- Vazquez-Levin MH, Notrica JA, and deFried EP. 1997. Male immunologic infertility: sperm performance on in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 68(4):675-681.
- Wagner A, Holland OJ, Tong M, Shelling AN, and Chamley LW. 2015. The Role of SPRASA in Female Fertility. *Reproductive Sciences* 22(4):452-461.
- Wang C, and Swerdloff RS. 2014. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertility and Sterility* 102(6):1502-1507.
- Wei SG, Wang LF, Miao SY, Zong SD, and Koide SS. 1995. Expression of the calpastatin gene segment during spermiogenesis in human testis - an in-situ hybridization study. *Archives of Andrology* 34(1):9-12.
- WHO. 1999. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.
- Williams J, Samuel A, and Naz RK. 2008. Presence of antisperm antibodies reactive with peptide epitopes of FA-1 and YLP(12) in sera of immunoinfertile women. *American Journal of Reproductive Immunology* 59(6):518-524.
- Witkin SS, and Chaudhry A. 1989. Relationship between circulating antisperm antibodies in women and autoantibodies on the ejaculated sperm of their partners. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161(4):900-903.
- Witkin SS, and Toth A. 1983. Relationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid, and infertility. *Fertility and Sterility* 40(6):805-808.
- Wolkowicz MJ, Digilio L, Klotz K, Shetty J, Flickinger CJ, and Herr JC. 2008. Equatorial segment protein (ESP) is a human alloantigen involved in sperm-egg binding and fusion. *Journal of Andrology* 29(3):272-282.
- Wyatt CR, Law L, Magnuson JA, Griswold MD, and Magnuson NS. 1988. Suppression of lymphocyte proliferation by proteins secreted by cultured Sertoli cells. *Journal of Reproductive Immunology* 14(1):27-40.
- Yan YC, Bai Y, Wang LF, Miao SY, and Koide SS. 1990. Characterization of cDNA-encoding a human sperm membrane protein related to A4 amyloid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(7):2405-2408.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Neill Ka, editor. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p 189-317.
- Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM, and Tung KSK. 1988. Autoantigenic germ cells exist outside the blood-testis barrier. *Journal of Immunology* 141(4):1161-1167.

## **Internetové zdroje**

URL 1 < <http://cssmweb.webnode.cz/news/spermiologicke-vysetreni/> > citováno 04. 04. 2017